

⑫ 公開特許公報 (A) 平3-30667

⑬ Int.Cl.³C 12 N 1/16
C 08 B 37/00
C 12 P 19/04

識別記号

府内整理番号

G 9050-4B
P 7019-4C
A 8214-4B *

⑬ 公開 平成3年(1991)2月8日

審査請求 未請求 請求項の数 7 (全11頁)

⑭ 発明の名称

コレステロール及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性多糖類を生産するキヤンディダ・ケフィール及びキヤンディダ・テヌス、その生産する酸性多糖類

⑭ 特 願 平1-165077

⑭ 出 願 平1(1989)6月27日

特許法第30条第1項適用 平成元年3月10日 社団法人日本畜産学会発行の「日本畜産学会第81回大会要旨」に発表

⑮ 発明者 渡邊 乾二 愛知県名古屋市緑区鳴海町黒石2番地の154

⑯ 発明者 中村 良 愛知県名古屋市緑区鳴海町篠ノ風7番地の6

⑰ 出願人 雪印乳業株式会社 北海道札幌市東区苗穂町6丁目1番1号

⑱ 代理人 弁理士 宮田 広豊 外1名

最終頁に続く

明細書

1. 発明の名称

コレステロール及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性多糖類を生産するキヤンディダ・ケフィール及びキヤンディダ・テヌス、その生産する酸性多糖類

ダ・テヌスを培養し、培養上清から酸性多糖類を採取することを特徴とする酸性多糖類の製造法。

2. 特許請求の範囲

- (1) コレステロール及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性多糖類を生産するキヤンディダ・ケフィールまたはキヤンディダ・テヌス。
- (2) 微研国寄第10731である請求項(1)に記載のキヤンディダ・ケフィール。
- (3) 微研国寄第10770である請求項(1)に記載のキヤンディダ・テヌス。
- (4) キヤンディダ・ケフィールまたはキヤンディダ・テヌスを培養して得られる培養上清を有効成分とすることを特徴とするコレステロール及び酸化コレステロール吸着剤。
- (5) キヤンディダ・ケフィールまたはキヤンディ

(6) キヤンディダ・ケフィールまたはキヤンディダ・テヌスを培養し、培養上清から採取される次の構成糖を示す酸性多糖類。

- (i) キヤンディダ・ケフィールの構成糖
ガラクトースとウロン酸から成る酸性多糖類
- (ii) キヤンディダ・テヌスの構成糖
ガラクトース、グルコース、ウロン酸から成る酸性多糖類
- (7) キヤンディダ・ケフィールまたはキヤンディダ・テヌスが生産する酸性多糖類を有効成分とすることを特徴とするコレステロール及び酸化コレステロール吸着剤。

3. 発明の詳細な説明

産業上の利用分野

本発明は、コレステロール及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性多糖類を生産するキヤ

ンディダ・ケフィール及びキャンディダ・テヌス、その生産する酸性多糖類及びその製造法並びにこの培養上清、酸性多糖類等を有効成分とするコレステロール及び酸化コレステロール吸着剤に関する。

本発明の吸着剤は、食品中に存在するコレステロールあるいは変異原物質である酸化コレステロールといった生体有害物質を吸着する作用を有するので、これらを食品中から除去したり、消化管内から体外への排出を促進する目的で飲食品に添加することのできる機能性食品素材として利用することができる。また食品や生体試薬等からこれらの物質を分別、分離し、定性、定量する目的の試薬としても利用することができる。

従来の技術及び解決しようとする課題

本発明者等は、ロドコッカス属(*Rhodococcus* sp.)やバシルス属(*Bacillus* sp.)の微生物が、水溶性多糖類を生産し、これが水不溶性のコレステロールを吸着して水溶性とすることを報告してき

た。しかし、乳用酵母がこのような性質を有する水溶性多糖類を生産するという報告はなされていない。本発明者等は、多数の乳用酵母について有用な性質をもつ水溶性多糖類の生産能についての検討を行ったものである。

課題を解決するための手段

本発明者は、多数の乳関連ストックカルチャーの酵母あるいは乳製品より分離した酵母について、コレステロール添加培地での培養過程において、コレステロール吸着性成分を産生する酵母の検索を行った。その結果、アルコール性発酵乳飲料のシードカルチャーとして用いられるケフィール粒から分離されたキャンディダ・テヌス(*Candida lenuis*)及びキャンディダ・ケフィール(*Candida kefyr*)がこのような活性のある株であることを見出し、活性成分の精製と諸性質の解析を行って本発明を完成するに至つた。さらに、本発明では、変異原物質である酸化コレステロールも吸着することにより、本活性成分が脱変異原作用を有するか否か

についてもあわせて検討を行つた。

すなわち、本発明は、

- (1) コレステロール及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性多糖類を生産するキャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌス。
- (2) 微研菌寄第10731である請求項(1)に記載のキャンディダ・ケフィール。
- (3) 微研菌寄第10770である請求項(1)に記載のキャンディダ・テヌス。
- (4) キャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌスを培養して得られる培養上清を有効成分とすることを特徴とするコレステロール及び酸化コレステロール吸着剤。
- (5) キャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌスを培養し、培養上清から酸性多糖類を採取することを特徴とする酸性多糖類の製造法。
- (6) キャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌスを培養し、培養上清から採取される

次の構成糖を示す酸性多糖類。

(i) キャンディダ・ケフィールの構成糖

ガラクトースとウロン酸から成る酸性多糖類

(ii) キャンディダ・テヌスの構成糖

ガラクトース、グルコース、ウロン酸から成る酸性多糖類

(iii) キャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌスが生産する酸性多糖類を有効成分とすることを特徴とするコレステロール及び酸化コレステロール吸着剤に関する。

本発明におけるケフィール粒から分離されたキャンディダ・テヌス SBT 5287 (*Candida lenuis*)は次のような生物学的性質を有する。

形状・大きさ	長卵円形 2~4×5~10μ
増殖形式	出芽
子囊胞子	-
偽菌糸	+

イーストエキス・グルコース ペプトン培地 (25℃)	生育 リソング 沈殿	旺盛 細顆粒状	メレチース キシロース アラビノース リボース ラムノース	+
ボテトデキストローズ 寒天培地 (25℃)	生育 色	旺盛 クリーム スムース		
アルブチン分解性	+			
硝酸塩変化性	-		また、同様にケフィール粒から分離されたキャ ンディダ・ケフィール SBT 5286 (<i>Candida kefyr</i>)	
カロチノイド色素生産性	-		は次のような菌学的性質を有する。	
糖発酵性 グルコース	+		形状・大きさ 長卵円形 3~8×5~13μ	
ガラクトース	土		増殖形式 出芽	
ショクロース	-		子嚢胞子 ゴロドコワ培地	-
マルトース	-		マッククラーク培地	-
ラクトース	-		人參培地	-
糖変化性 ガラクトース	土		馬鈴薯培地	-
ショクロース	+		イーストエキス・麦芽エキス 生育 培地 (25℃) 皮膜・リング	旺盛
マルトース	+		沈殿 細顆粒状	-
セロビオース	+		ボテトデキストローズ 生育 寒天培地 (25℃) 色	旺盛 クリーム色
ラクトース	-		カロチノイド色素生産性	スムース
メリビオース	-			-
ラフィノース	-			
澱粉様物質生産性	-		リボース	-
硝酸塩変化性	-		ラクトース	+
糖発酵性 グルコース	+		本発明者等は、これらの性質をもとに、「 <i>The yeasts — a taxonomic study</i> 」(N.J.W. Kreger - van Rij 編 1984)に従って検討した結果、前者 をキャンディダ・テヌス (<i>Candida lenuis</i>)、後 者をキャンディダ・ケフィール (<i>Candida kefyr</i>) と同定した。しかし、通常のキャンディダ・テヌ ス、キャンディダ・ケフィールは、コレステロー ル及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性 多糖類を産生しないのに対し、本発明のものは酸 性多糖類を産生し、この性質は継代培養によって 変化しないことから本発明のキャンディダ・テヌ ス、キャンディダ・ケフィールは通常のキャン ディダ・テヌス、キャンディダ・ケフィールの変 異株と考えられる。	
糖変化性 ガラクトース	+		本発明者等は、上記した性質を有する菌株を、 他の公知の株と区別するため、工業技術院微生物 工業技術研究所に前者は受託番号微工研菌寄第	
ラフィノース	土			
ショクロース	+			
マルトース	-			
キシロース	-			
セロビオース	-			
アラビノース	-			
トレハロース	-			

10770 (FERM p-10770) 後者は受託番号微研菌寄第10731 (FERM p-10731) として寄託した。

本発明では、これらの菌株の自然変異株、あるいは紫外線照射、コバルト60照射、化学変異誘導剤処理等の人工的変異処理で変異させた人工変異株であってもそれがコレステロール及び酸化コレステロールの吸着能を有する酸性多糖類を生産する限り、利用可能である。

本発明では、これらの酵母がコレステロール吸着活性を示すか否かについて次の実験を行って検討した。

すなわち、ラクトース4.0%、ポリベプトン1.0%、酵母エキス0.5%、 KH_2PO_4 0.5%及び $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2%よりなり pH 6.0 に調整した液体培地に、コレステロールを0.1%添加し、10mLずつ試験管に分注、キャンディダ・テヌスまたはキャンディダ・ケフィールの菌株を前培養から3白金耳づつ接種し、37°Cで振盪培養を行い、菌体当たりのコレ

るコレスタン- $3\beta,5\alpha,6\beta$ -トリオール (以下 C T という)、25-ハイドロキシコレステロール (以下 H C という) についても同様の事実を確認した。

そして、本発明では、実施例2の方法によってキャンディダ・テヌス培養上清からDEAB-セファロースクロマトグラフィによって酸性多糖類を単離し、その物性値及びコレステロール、酸化コレステロール吸着能を検討した。

また、実施例3の方法によってキャンディダ・ケフィールの培養上清についてコレステロールを吸着する酸性多糖区分を分離した。

以下に本発明の実施例を示し、本発明を詳細に説明する。

ステロール吸着量、培養上清におけるコレステロール吸着量及び培養上清中の糖含量を測定した。

この結果、培養後4日間は菌体に吸着されるコレステロールが増加し、その後減少するが、培養上清におけるコレステロール吸着量は4日目から増加する。一方、培養液中の糖含量は培養後一度減少するが4日目前後から次第に増加していく。

このような変化から、培地成分としての糖類がまず消費され、その後、コレステロール吸着能を有する酸性多糖類が産生されることによってコレステロールが吸着され、結果的に培養上清のコレステロール吸着量が増大するものと思われた。

そこで本発明では、キャンディダ・ケフィールまたはキャンディダ・テヌスの培養上清について、実施例1の方法によってこの事実を確認した。この事実は、第1表に示されるようにキャンディダ・テヌス、キャンディダ・ケフィールに特異的にみられ、その他の酵母ではほとんどみられなかった。また、コレステロールの加熱酸化生成物であ

第1表
コレステロールを吸着する多糖類を産生する酵母

菌株	コレステロール吸着量 (mg/tube)*
キャンディダ・テヌス (<i>Candida tenuis</i>) SBT 5287	4.19
キャンディダ・テヌス (<i>Candida tenuis</i>) IFO 0716	0.17
キャンディダ・リポリティカ (<i>Candida lipolytica</i>) IFO 0717	0.16
キャンディダ・リポリティカ (<i>Candida lipolytica</i>) IFO 0746	0.09
キャンディダ・リポリティカ (<i>Candida lipolytica</i>) IFO 0707	0.06
キャンディダ・ケフィール (<i>Candida kefyr</i>) SBT 5286	3.00

注) * コレステロール 10mg/tube

実施例1

(1) 培養上清の調製：

キャンディダ・ケフィール SBT 5286 または
キャンディダ・テヌス SBT 5287 を、ラクトース4.0%、
ポリベブトン1.0%、酵母エキス0.5%、KH₂PO₄
0.5%及びMgSO₄·7H₂O 0.2%よりなり、pH 6.0に
調整された培地に接種し、37℃で4日間振盪培養
し、培養液を6000rpmで30分間遠心分離して菌体
を離別し、培養上清を得た。

(2) 培養上清のコレステロール及び酸化コレステロール吸着能：

この培養上清にエタノールを66%濃度まで添加し、生じた沈澱を7000rpmで12分間遠心分離することによって除去した後、その上清を中型試験管に0、1、3、5mLずつ分取し、全体量を50mLリソ酸緩衝液(pH 7.0)で5mLとした。これにコレステロールを5mgずつ添加、37℃で一夜振盪し、振盪後吸着されていない不溶性コレステロールを離別して得られる懐液を、凍結乾燥し溶液中に移行

してくるコレステロール量をピアソン等の方法によって測定した。この結果を第1図に示す。この結果、培養上清10mL当たり3~4mgのコレステロールを吸着することが明らかとなった。

また、変異原物質であるCT、HCに対する脱変異原作用については、サルモネラ・チヒムリウム (*Salmonella typhimurium*) TA98株(以下TA98株という)を用いたAmes法によってその効果を判定した。常法のAmes法を行うに当り、TA98株生育培地中に上記培養上清を1~5mL添加した時のコロニー出現率を対照と比較した結果を第2図に示す。この結果、培養上清を1mL以上添加することにより、TA98株のコロニー出現率はHCで50%前後、CTで25%前後まで低下し、明らかに培養上清に脱変異原作用のあることが認められた。

また、このような上清のコレステロール吸着活性は、pH 4~10の範囲で比較的安定していることを確認した。

実施例2

(1) 酸性多糖類の調製：

キャンディダ・テヌスから得られた実施例1の上清に、エタノールを70%濃度まで添加し、生ずる沈澱を7000rpm、12分間遠心分離して分取した。この沈澱部分を酢酸緩衝液(pH 6.0)に溶解し、DEAE-セファローズCL-6Bクロマトグラフィにかけた。0.5~1.0M NaCl水溶液で溶出して得られる溶出液を透析し、凍結乾燥することにより粗酸性多糖類を得た。さらにこの粗酸性多糖類をセファローズCL-4Bクロマトグラフにかけ、溶出物を凍結乾燥することによって精製酸性多糖類を得た。この粗製酸性多糖類の收率は、培養上清10mLあたり2.0~2.2mgであった。

また、このクロマトグラフの溶出フラクションを第3図に示す。

本発明をなす活性はフラクション(4)に認められた。

(2) 精製酸性多糖類(フラクション(4))の物性値

(i) 吸光度

フェノール硫酸法によると通常の糖と同様に490nmに吸光度を示す。

(ii) 電気泳動

フラクション(4)をセルローズ・アセテート電気泳動にかけると第4図に示すような単一スポットを示す。

(iii) ¹³C NMR

フラクション(4)の¹³C NMRは第5図のとおり。フラクション(4)の酸性多糖類を加水分解してガスクロマトグラフィーにかけた結果を第6図に示す。構成糖の中性糖としてガラクトースとグルコースが認められた。また、本フラクションはセチルトリメチルアンモニウムプロマイドの添加によって沈澱が生じること、カルバゾール硫酸法によって特異的な呈色が認められることからウロニ酸の存在が確認された。

実施例3

(1) 酸性多糖区分の分離：

キャンディダ・ケフィールから得られた実施例

1の培養液を6000rpm、30分間遠心分離して菌体を除去した後、pH7.5に調整した。この培養上清を試験管に分注後、コレステロールを0.1%添加し、37℃で1夜振盪した後に不溶性コレステロールを通過し、得られた濁液をpH3.0に調整して氷中に1夜放置して沈澱を生成させた。これを6000rpmで30分間遠心分離し上清と沈澱とに分けた。上清及び沈澱のコレステロール含量を測定したところ上清中にはその乾燥重量に対して0μgであるのに対し、沈澱部分には77μg存在し、上清にはコレステロールは全く吸着されないのに対し、沈澱部分にのみコレステロールが吸着されることが認められた。そこで、沈澱をpH7.5で氷に溶解し、流水透析した後、凍結乾燥してコレステロールを吸着している酸性多糖区分を得た。

(2) Bio-gel-P-150カラムクロマトグラフィー：

10mMリン酸緩衝液(pH7.0)で膨潤させたBio-gel-P-150(Bio Rad社製)をカラム(2.5×64cm)に充填し、約200μlの同緩衝液で平衡化・洗浄を行った。

この表からみて、Fr. Aが他のフラクションに比べてコレステロール吸着活性が高い。

(3) Fr. AのBio-gel-P-150カラムクロマトグラフィー：

Fr. Aの単一物質を得るために本部分をさらに流水透析、凍結乾燥を行った後、上記の方法によってBio-gel-P-150カラムクロマトグラフィーで再クロマトを行った。得られた各フラクションの糖、コレステロール、蛋白質及び280nmにおける吸光度を測定した。なお、糖及びコレステロールは、上記と同一方法で、蛋白質はLowry法によって測定した。

その結果を、第9図に示す。

第9図では、糖と蛋白質との最初のピークはほんと重なるが、コレステロールは最初のピークにだけ検出されたので、このフラクションをFr. A'とした。

さらにFr. A'を上記方法によって再度Bio-gel-P-150カラムクロマトグラフィーにかけたと

行った。前記酸性多糖区分を同緩衝液に溶解し、カラムにかけ同緩衝液で溶出させた。各溶出画分中の糖をフェノール硫酸法で、またコレステロールをピーソンらの方法によって定量した。その溶出パターンを第7図(脱コレステロール化前)及び第8図(脱コレステロール化後)に示す。コレステロール及び糖の含量からみた場合、各試料はFr. A、Fr. B、Fr. Cの3フラクションに分れた。さらにこれらコレステロールを吸着している状態の酸性多糖類及びコレステロールを遊離、除去した後の酸性多糖類をカラム処理し、得られた各フラクションとコレステロールを再び混合振盪させ、各Fr.に吸着させた場合のコレステロール含量を第2表に示す。

第2表

	単位 μg/mg(乾物)		
	Fr. A	Fr. B	Fr. C
脱コレステロール化前	357	86	84
脱コレステロール化後	208.6	6.3	6.1

ころ、第10図に示すような溶出パターンが得られ、糖、蛋白質、コレステロールのピークが一致した。このフラクションをFr. A'とした。このフラクションがコレステロール吸着活性が最も高かった。

(4) SDS-PAGE電気泳動

7.5% SDSを含むミニスラブゲルを用いてSDS-PAGE電気泳動をFr. A、Fr. B、Fr. C及びFr. A'について行った。

すなわち、各フラクションの乾燥重量1mgを水40μlに溶解し、1/15Mリン酸緩衝液(pH7.0)10μlを加え、100℃で3分間加熱後、その10μlを0.1%SDSを含むトリスーグリシン緩衝液を用いて10mM、2時間30分泳動させた。糖の検出はPAS染色で、蛋白質の検出はクマーシーブリリアントブルー-R 250染色で行った。その結果、Fr. Aは糖が泳動距離に応じてゲルの上、中及び下部の3箇所に認められ、また、最下部の糖と同位置に蛋白質が存在した。Fr. BはFr. Aと同様の泳動像を

示したが、各スポット共全体に薄くテーリングしているのが認められた。Fr. C は下部 1ヶ所にのみ糖が認められ、また、同位置に蛋白質も存在していた。

一方、Fr. A' は、ゲル上部に 1ヶ所、濃い糖のスポットが検出され、その位置には蛋白質が認められなかった。

このことから、最もコレステロール吸着活性の高い Fr. A' は低分子の蛋白質が混在している状態であるといえる。このことは、Fr. A または Fr. A' をプロテアーゼ処理してもコレステロール吸着に何ら影響を及ぼさないことからも確認できた。

Fr. A 及び Fr. A' は、セチルトリメチルアンモニウムプロマイドの添加によって沈澱を生じること、また、カルバゾール硫酸法によって特異的な呈色が認められることからウロノン酸の存在が確認され、また、ガスクロマトグラフィーによる分析の結果、中性糖はガラクトースであることが認

実施例 2 及び 3 による酸性多糖類 10mg と乳糖 50.0mg を加えて錠剤とした。本錠剤を毎日経口的に飲用すると健康上有用である。

本発明において、これを吸着剤として利用するには、培養上清は加熱殺菌し、そのまま、または濃縮し、あるいは凍結乾燥して、また酸性多糖類はそのまま使用できる。

これらを錠剤にしたり、飲料、肉製品、パン、麺類等の飲食品に添加して使用する。使用量は 1 日成人当り 10~100mg が適当である。またこれらの物質は毒性はほとんどない。

発明の効果

本発明によるキャンディダ・ケフィール、キャンディダ・テヌスはコレステロール及び酸化コレステロールを吸着する性質のある酸性多糖類を高収率に生産する。そして得られる培養上清、酸性多糖類は、コレステロール及び酸化コレステロールを吸着するので、コレステロール等を含む食品等に添加してコレステロール等を除去することも

められたことから、本活性画分はガラクトースとウロノン酸から成る酸性多糖類であるといえる。

実施例 4

酸性多糖類のコレステロール及び酸化コレステロール吸着能：

実施例 1 に準じ、50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) 5ml にコレステロールを 5mg、精製酸性多糖類を 1mg 添加、対照として各種多糖類を 10mg づつ添加し、37℃ で一夜振盪した後、多糖類に吸着したコレステロール量を測定した。

第 1~1 図にキャンディダ・テヌス SBT 5287 株から得られた酸性多糖類のコレステロール吸着活性を、その他の多糖類のそれと比較した結果を示す。この結果から酸性多糖類のコレステロール吸着活性が、(1) アミロース、β-シクロデキストリン等、(2) アラビヤゴム等、(3) キチン等のそれに比べて著しく高いことが判明した。

実施例 5

吸着剤としての用途：

できるし、あるいはこれを飲料、カプセル剤等に加工して飲用し、健康を維持することもできる。

4. 図面の簡単な説明

第 1 図は、キャンディダ・テヌスの培養上清の容量とコレステロール吸着量との関係を、第 2 図は、培養上清の容量と脱変異原作用との関係を、第 3 図は、酸性多糖類のカラムクロマトグラフによる溶出状態を、第 4 図はそのセルローズ・アセテート電気泳動図を、第 5 図は ¹³C NMR を、第 6 図はそのガスクロマトグラフをそれぞれ示す。

第 7 図は、キャンディダ・ケフィールの培養液にコレステロールを加えて生ずる沈澱画分を水に溶解後 Bio-gel-P-150 カラムクロマトグラフィーにかけた場合の溶出パターンを、第 8 図は、この画分を脱コレステロール化した後の溶出パターンを示す。図中、○-○は糖を、×-×はコレステロールをそれぞれ示す。

第 9 図は、上記 Bio-gel-P-150 の Fr. A を再度 Bio-gel-P-150 カラムクロマトグラフィーにかけ

た溶出パターンを、第10図はその Fr. A' を再々度 Bio-gel-P-150カラムクロマトグラフィーにかけた溶出パターンをそれぞれ示す。図中、○-○、×-×は第8図及び第9図と同様であり、△-△は蛋白質を、また●-●は280nmにおける吸光度をそれぞれ示す。

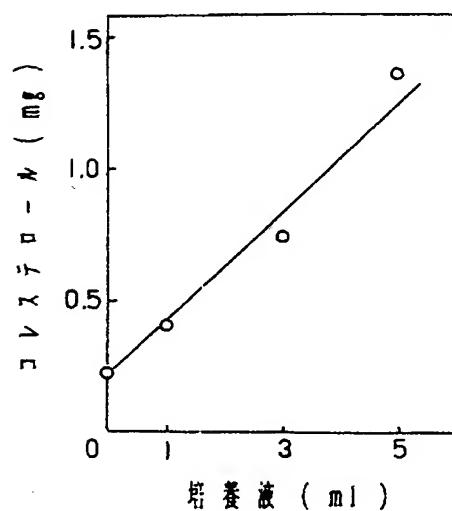
第11図は、多糖類 (10mg/5ml) のコレステロール吸着活性を示す。図において

(1) はアミロース、セルロース、 β -サイクロデキストリン、デキストラン、イヌリン、コンニャクマンナン、ブルラン、可溶性澱粉のそれを、

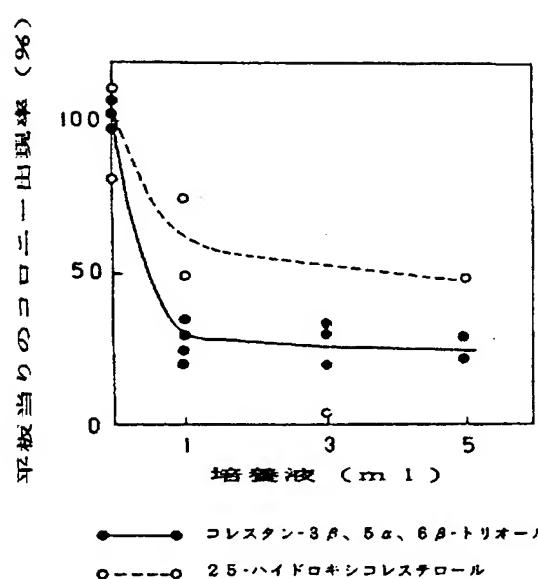
(2) はアラビヤゴム、カラギーナン、グリコーゲン、ローカストビーンガム、ベクチン、キサンタンガムのそれを、

(3) はキチン、ヒアルロン酸ナトリウム塩、アルギン酸ナトリウムのそれを、

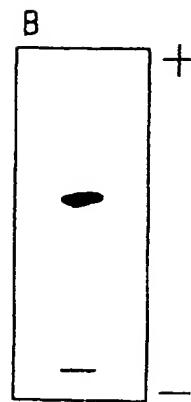
(4) はキャンディグ・テヌス SBT 5287 の酸性多糖類のそれをそれぞれ示す。



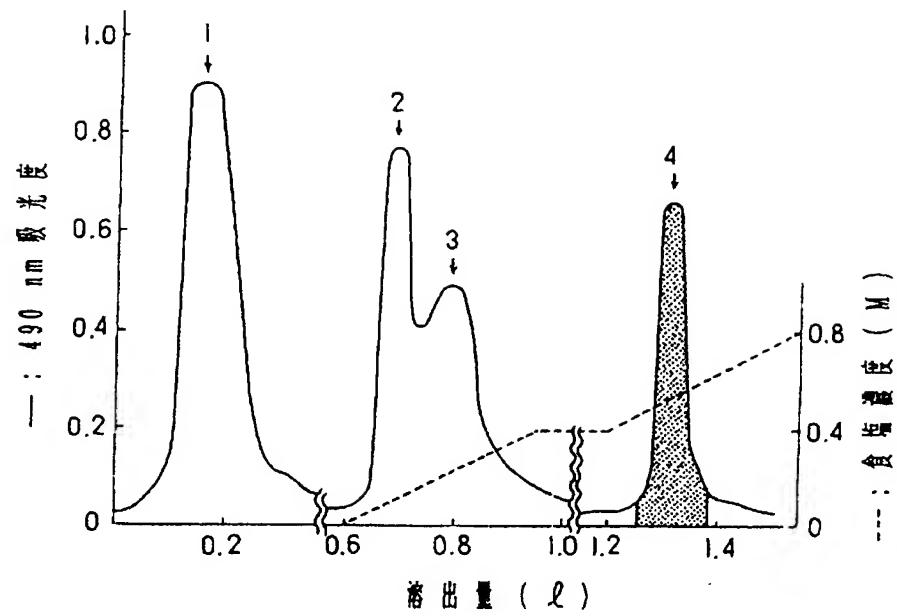
第1図



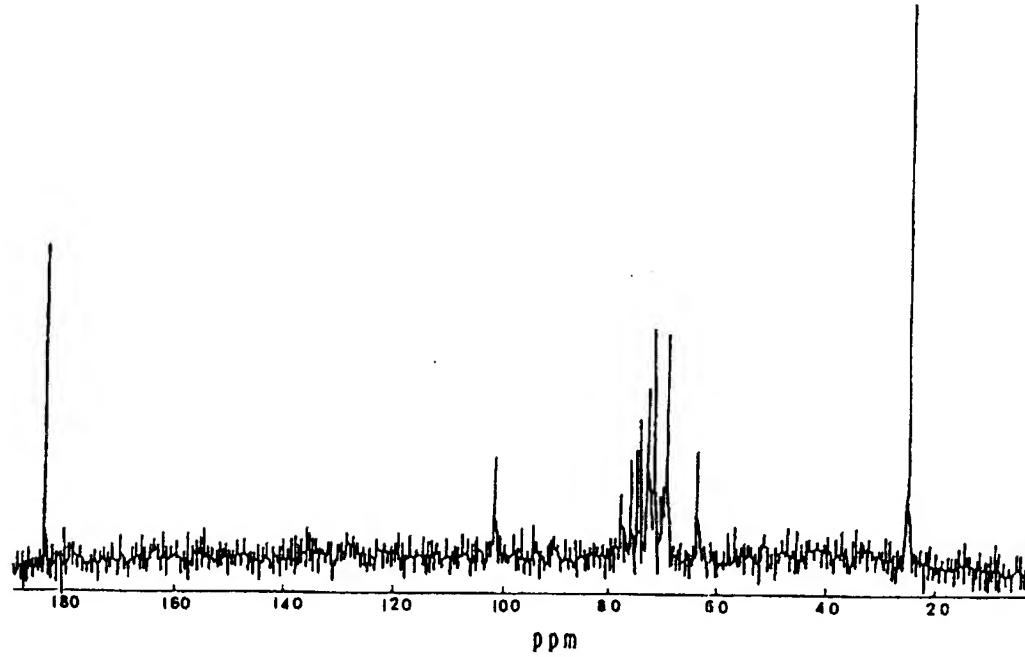
第2図



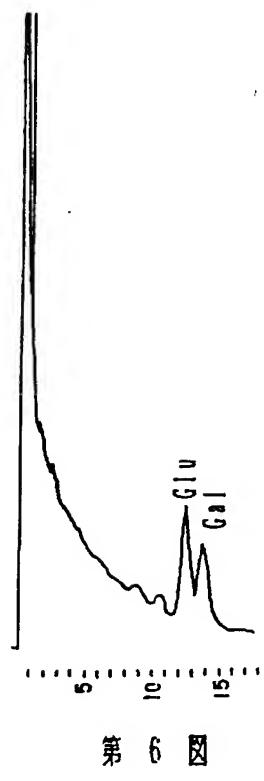
第4図



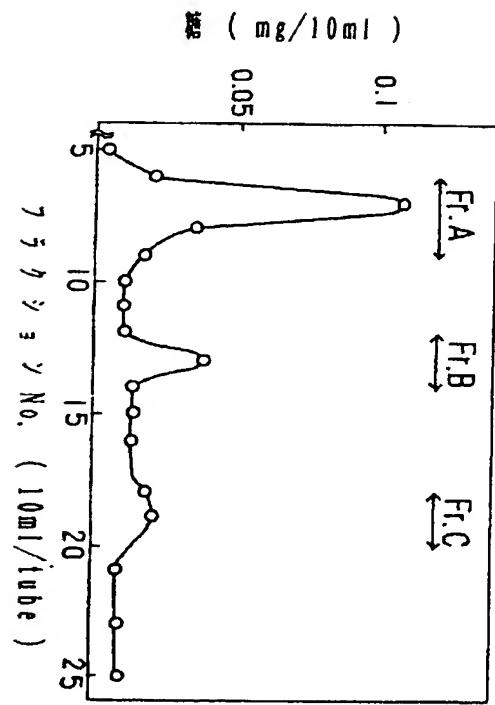
第3図



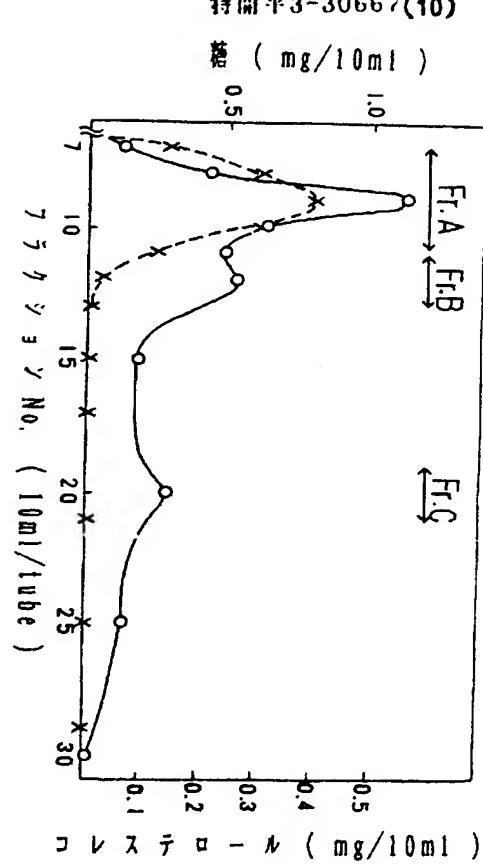
第5図



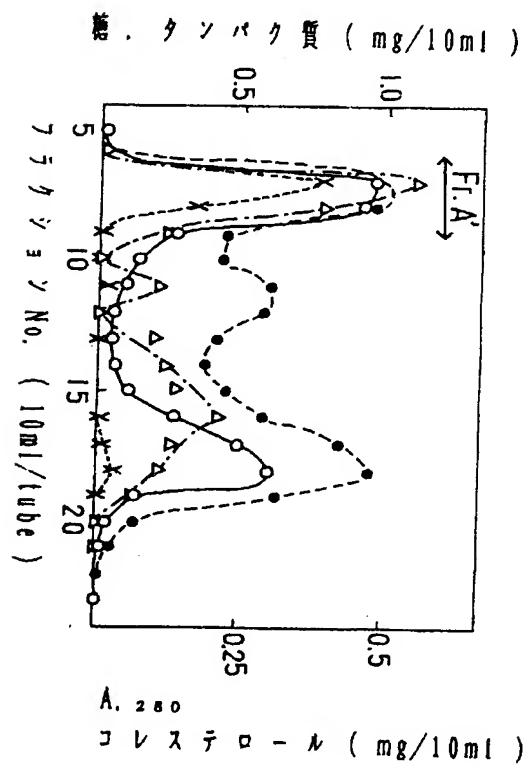
第 8 図

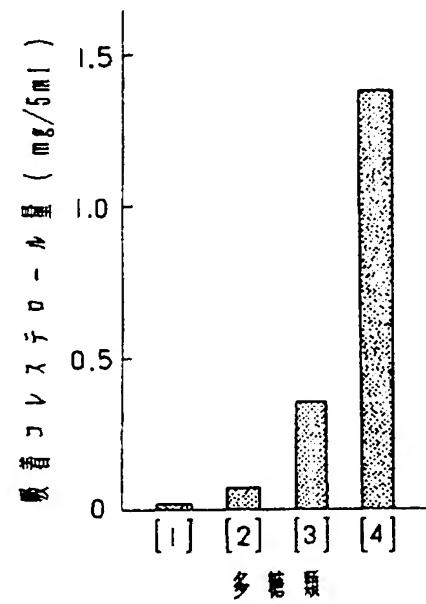
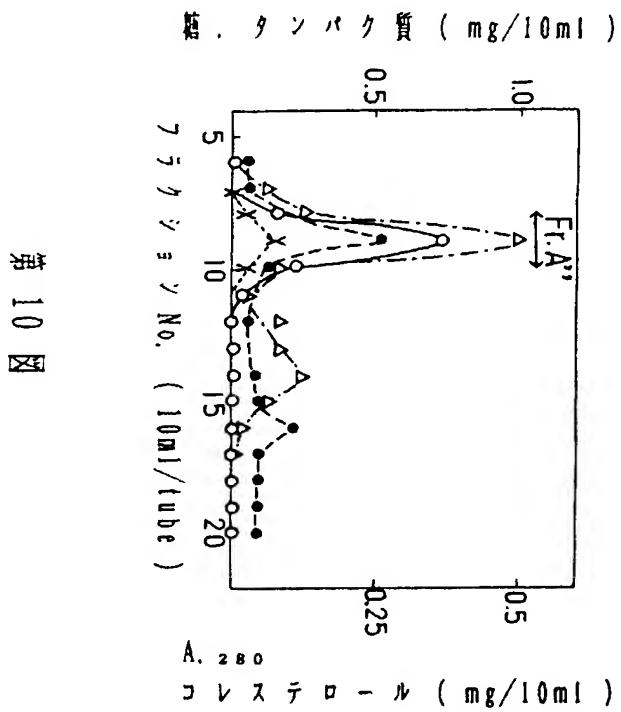


第 9 図



第 1 図





第1頁の続き

⑤Int.Cl.⁵ 識別記号 市内整理番号
 // A 23 L 1/30 Z 8114-4B
 (C 12 N 1/16
 (C 12 R 1:72)
 (C 12 P 19/04
 (C 12 R 1:72)